



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62,</b> <b>C07K 19/00, 16/08, C12N 15/87</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26379</b> <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/03506 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. November 1999 (03.11.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 50 718.6      3. November 1998 (03.11.98)      DE <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HILDT, Eberhard [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHMIDT, Stephanie [DE/DE]; Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE). <b>(74) Anwalt:</b> SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> POLYPEPTIDE MEDIATING CELL PERMEABILITY <b>(54) Bezeichnung:</b> ZELLPERMEABILITÄT-VERMITTELNDES POLYPEPTID <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to a cell-permeable polypeptide that can mediate cell permeability to substances, DNA coding for said polypeptide and a method for the production of said polypeptide. The invention also relates to antibodies directed against said polypeptide and the use of said polypeptide in the mediation of cell permeability to substances.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### **Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid  
5 kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.

Mit Zellpermeabilität wird die Eigenschaft von Substanzen bezeichnet, in Zellen  
10 einzudringen. Diese Eigenschaft findet sich allerdings nur bei wenigen Substanzen. Die meisten Substanzen benötigen Hilfsmittel bzw. Verfahren, um in Zellen einzudringen. Beispiele hierfür sind Mikroinjektion, Elektroporation, Assoziation mit kationischen Lipiden, Liposomenbildung, Rezeptor-vermittelte Endocytose und Virusinfektion. Diese Hilfsmittel bzw. Verfahren weisen jedoch große Nachteile auf.  
15 Insbesondere sind sie teuer, erfordern komplexe Versuchsanordnungen und sind nur begrenzt einsetzbar. Ferner ist ihre Effizienz gering und sie erweisen sich oft als toxisch.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde ein Mittel bereitzustellen, mit dem Substanzen in Zellen eingebracht werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.  
20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.  
25

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß ein Polypeptid, das vorzugsweise die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt, in Zellen eindringen kann, d.h. Zellpermeabilität aufweist. Er hat ein solches Polypeptid in der PreS2-Region eines Hepatitis B Virus (HBV)-Oberflächenproteins  
30 gefunden. Das Polypeptid wird nachstehend mit ZPP "Zellpermeabilität-ver-

mittelndes Polypeptid" bezeichnet. ZPP weist die Struktur einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß ZPP die Eigenschaft hat, Zellpermeabilität an Substanzen zu vermitteln. Diese können dann in Zellen eindringen, wobei die Zellpermeabilität der Substanzen nicht auf bestimmte Zellen beschränkt ist.

5 Auch behalten die Substanzen ihre Aktivitäten bei (vgl. Fig. 2). Varianten des erfindungsgemäßen ZPP aus verschiedenen HBV-Subtypen, die sich von der Sequenz von Fig. 1 durch eine oder mehrere Aminosäuren unterscheiden, sind in Fig. 3 gezeigt. Der Aminosäure-Sequenz von Fig. 1 (= PreS2-TLM) entspricht beispielsweise der Subtyp ayw (1) auf der Aminosäureebene vollständig, während

10 die anderen Subtypen demgegenüber einen oder mehrere Austausche aufweisen. Man sieht aber, daß zwischen verschiedenen HBV-Subtypen eine Konservierung bestimmter Aminosäuren vorhanden ist. Diese läßt sich insbesondere durch die graphische Darstellung der Hydrophobizitätswerte bestätigen. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß selbst bei einem Austausch von einer oder mehreren

15 Aminosäuren, die Hydrophathie-Verteilung im Gesamtmolekül erhalten bleiben sollte. Aufgrund dieses Befunds ist es für den Fachmann leicht möglich, Varianten der Sequenz von Fig. 1 zu bestimmen, da nicht die Sequenz als solche entscheidend ist, sondern das Hydrophathieprofil im Gesamtmolekül. Entsprechendes gilt für verschiedene aviane Hepadnaviren (vgl. Fig. 4) bzw. Hepadnaviren der Nagetiere

20 (vgl. Fig. 5). Diese werden jeweils mit einem erfindungsgemäßen ZPP gemäß Fig. 1 (= PreS2-TLM) verglichen und Hydrophathie-Profile aufgestellt. Aus diesen ist ersichtlich, daß selbst bei einem fast vollständigen Austausch der Aminosäuren (z.B. HHBV  $\leftrightarrow$  PreS2-TLM) das Hydrophathie-Profil im wesentlichen erhalten bleibt. Dies bedeutet, daß nicht die Sequenz an sich, sondern die Abfolge hydro-

25 philer und hydrophober Aminosäuren in einem  $\alpha$ -helikalen Motiv entscheidend ist. In einem 12 Aminosäuren umfassenden Peptid sind vorzugsweise die Positionen 2, 5 und 9 von hydrophoben Aminosäuren und die Positionen 3, 4, 8 und 11 von hydrophilen Aminosäuren besetzt. Zu den hydrophoben Aminosäuren zählen Valin, Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Phenylalanin und Methionin. Zu den hydrophi-

30 len Aminosäuren zählen Glycin, Serin, Tyrosin, Threonin, Cystein, Asparagin und Glutamin. So gehorcht ein erfindungsgemäßes ZPP der folgenden allgemeinen Formel:

X o i i o X X i o X i X

mit X = Variable Aminosäure (hydrophil, hydrophob oder mit geladenen Seitengruppen)

5 o = hydrophobe Aminosäure

i = hydrophile Aminosäure

10 Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen sind Aspartat, Glutamat (besitzen beide neg. geladene Seitengruppen), Lysin, Asparagin, Glutamin, Arginin und Histidin (besitzen pos. geladene Seitengruppen).

15 Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Polypeptid (ZPP) bereitzustellen, das Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, wobei ZPP die oben angegebene Sequenz bzw. vorzugsweise die Sequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und die DNA der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.

20 Der Ausdruck "Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen" weist darauf hin, daß ZPP Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und Abstammung vermitteln kann. Die Substanzen können z.B. Polypeptide (Proteine), Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen sein. Beispiele von Polypeptiden sind Struktur-Polypeptide, Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Zytokine, wie IL-2, und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, tumorassoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. 25 Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden, Hormone und Ribozyme sein. Beispiele von Nukleinsäuren sind solche, die für vorstehende 30

Polypeptide kodieren. Ferner können es Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren und Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren sein. Beispiele von chemischen Verbindungen sind Arzneimittel, die keine Polypeptid-Struktur aufweisen. Solche können Cytostatika, Anästhetika, Antihistaminika, Antibiotika und Antimycotika sein. Zur Vermittlung der Zellpermeabilität kann es ausreichend sein, wenn ZPP zusammen mit einer Substanz inkubiert wird, so daß sich chemische Bindungen, z.B. kovalente bzw. nicht-kovalente Bindungen, ausbilden können. Günstig ist es, wenn ZPP über einen Linker mit der Substanz verbunden ist, wobei dies z.B. über Biotin/Streptavidin erfolgen kann. Der Linker kann am N- oder C-Terminus von ZPP vorliegen. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Substanz als Polypeptid zusammen mit ZPP in einem Fusionspolypeptid vorliegt. ZPP kann hierbei am N- oder C-Terminus bzw. innerhalb der Polypeptid-Struktur der Substanz vorliegen. Der Ausdruck "ZPP" umfaßt daher auch ein Fusionspolypeptid, in dem ZPP zusammen mit einer Substanz vorliegt. Die Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen kann durch übliche Verfahren nachgewiesen werden. Günstig ist es, Zellen mit ZPP verbundenen Substanzen zu inkubieren und das Eindringen bzw. Vorliegen von ZPP und/oder den Substanzen in den Zellen nachzuweisen. Dies kann z.B. durch spezifische Antikörper oder Reagentien erfolgen, die direkt oder indirekt mit ZPP bzw. den Substanzen reagieren.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche ein ZPP darstellende Aminosäuresequenz, die nicht ein natives HBV-Oberflächenprotein ist. Vorzugsweise hybridisiert eine Sequenz, die für "eine durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" codiert, mit der DNA-Sequenz von Fig. 1. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der Sequenz, hin.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ZPP kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist

eine DNA, die folgendes umfaßt:

(a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein ZPP kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert. Die DNA-Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 1 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen entsprechend verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 und 293, die Insekten-

zellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

5 Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen, Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw. trans-  
fizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch  
die erfindungsgemäße DNA exprimierte ZPP zu isolieren und zu reinigen.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ZPP gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden.  
Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig,  
Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für  
einen monoklonalen Antikörper, mit ZPP zu immunisieren. Weitere "Booster" der  
Tiere können ebenfalls mit ZPP erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus  
dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikör-  
15 per werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt  
eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- 20 (a) ein erfindungsgemäßes Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP),  
(b) eine erfindungsgemäße DNA,  
(c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie  
(d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

25 Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter  
vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen  
verwiesen.

30 Die vorliegende Erfindung ermöglicht es Zellpermeabilität zu vermitteln. Mit einem  
erfindungsgemäßen ZPP kann Zellpermeabilität an Substanzen jeglicher Art und  
Abstammung vermittelt werden. Die Zellpermeabilität ist universell, d.h. sie ist nicht  
auf bestimmte Zellen beschränkt. Auch können die Zellen ex vivo bzw. in vivo



vorliegen. Desweiteren löst die Zellpermeabilität keine toxischen Effekte aus.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens für Diagnose und Therapie. Letzteres umfaßt das Eingreifen in die Expression von Genen und in Stoffwechselprozesse. Besonders eignet sich die vorliegende Erfindung für die Diagnose und Therapie schwerster Erkrankungen, z.B. von Tumoren. Ganz besonders zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie sowohl für konservative als auch gentherapeutische Behandlungsmaßnahmen eingesetzt werden kann.

#### 10      **Kurze Beschreibung der Zeichnungen.**

**Fig. 1** zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen, Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).

15      **Fig. 2** zeigt den Nachweis von durch ZPP vermittelter Zellpermeabilität. Die Spuren 2 und 3 zeigen die Aktivierung von c-Raf1-Kinase. Die Spuren 4 und 5 zeigen deren Hemmung. Die Spuren 6 und 7 zeigen, daß mutiertes ZPP-PLAP (ZPP-KLAP) keine Hemmwirkung aufweist.

20      **Fig. 3** zeigt die Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen HBV-Subtypen sowie Hydropathieprofil

**Fig. 4** zeigt amphiphile Motive in der PreS-Region verschiedener avianer Hepadnaviren

25

**Fig. 5** zeigt amphiphile Motive in der PreS2-Region verschiedener Hepadnaviren der Nagetiere

**Fig. 6** zeigt, daß DHBV42-53-EGFP ein zellpermeables Protein ist

30

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Nachweis von durch ein erfindungsgemäßes Polypeptid (ZPP) vermittelter Zellpermeabilität.**

Der Nachweis einer durch ZPP-vermittelten Zellpermeabilität wird durch Hemmung  
5 der TNF $\alpha$ -abhängigen Aktivierung von c-Raf1-Kinase gezeigt. Die Aktivierung der c-Raf1-Kinase beruht auf der Interaktion des TNF-Rezeptors I (TNF-RI) mit dem Adaptermolekül Grb2. Hierzu interagiert die SH3-Domäne von Grb2 mit einem PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI.

10 Es wird ZPP in Form eines Fusionspolypeptids bereitgestellt. In diesem mit ZPP-PLAP bezeichneten Fusionspolypeptid liegt ZPP der Aminosäuresequenz von Fig. 1 als N-Terminuspartner und ein PLAP-Motiv aus der cytoplasmatischen Domäne von TNF-RI als C-Terminuspartner vor. Ferner wird ein mit ZPP-KLAP bezeichnetes Fusionspolypeptid bereitgestellt, bei dem das PLAP-Motiv mutiert ist.

15 HeLa Zellen werden 2 h mit 2 $\mu$ M ZPP-PLAP bzw. ZPP-KLAP (Kontrolle) inkubiert und 15 min mit 100 $\mu$ /ml TNF $\alpha$  stimuliert. Die Aktivierung von c-Raf1 Kinase wird durch einen Immunkomplex-Test unter Verwendung von MEK (Santa Cruz, Biotech) und  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP als Substrat bestimmt (vgl. Fig. 2).

20 Es zeigt sich, daß ZPP-PLAP in die Zellen gelangt und die Aktivierung von C-Raf1-Kinase vollständig hemmt (vgl. Fig. 2, Spuren 4 und 5). Ferner zeigt sich, daß ZPP-KLAP keine Hemmung erreicht (vgl. Fig. 2, Spuren 6 und 7).

25 **Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Zellpermeabilität-vermittelnden Polypeptids (ZPP).**

Die DNA von Fig. 1 wird am 5'-Ende mit einem BglII-Linker und am 3'-Ende mit  
30 einem BamHI-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BglII/BamHI-Fragment wird in den BamHI-gespaltenen Expressionsvektor pQe8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid

pQe8/ZPP erhalten wird.

Ferner wird aus dem Expressionsplasmid pGex-1 die eine für GST (Glutathion-S-Transferase) kodierende Sequenz isoliert. Diese weist an ihrem 5'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle gefolgt von einer für eine Thrombinschnittstelle kodierenden Sequenz auf. Ferner weist die Sequenz an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle auf. Die Sequenz wird in das BamHI-gespaltene Expressionsplasmid pQe8/ZPP inseriert, wodurch das Expressionsplasmid pQe8/ZPP-GST erhalten wird. Dieses kodiert für das Fusionspolypeptid ZPP-GST, pQe48/ZPP-GST wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Induktion wird mittels Ultraschall die Lyse der sedimentierten und gewaschenen Bakterien durchgeführt. Die Isolierung des ZPP-GST-Fusionspolypeptids erfolgt mittels Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Säule. Das gebundene ZPP-GST-Fusionspolypeptid wird mittels eines linearen Anstiegs der Glutathion-Konzentration von 0 auf 10 mM eluiert. Das eluierte ZPP-GST Fusionsprotein wird einer Thrombinspaltung unterzogen. Das dadurch freigesetzte Hexa-His-ZPP (Fusionspolypeptid) wird anschließend durch Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen mittels einer Ni-NTA-Agarose isoliert. Dies erfolgt in Gegenwart von 6 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen). Das gebundene Hexa-His-ZPP wird in einem Puffer mit pH 6,3 eluiert, der 250 mM Imidazol enthält. Das Hexa-His-ZPP wird einer 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)polypeptid in hochreiner Form hergestellt werden kann.

**Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

Ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 3 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen**

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0:	1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14:	2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28:	3. Immunisierung (icFA)
Tag 56:	4. Immunisierung (icFA)
Tag 80:	Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid von Beispiel 2 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen

mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 $\mu$ M 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

5

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

### **Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

10

Pro Immunisierung werden 40 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- |            |                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------|
| Tag 0:     | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)         |
| 15 Tag 28: | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 50:    | 3. Immunisierung (icFA)                                 |

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

20

### **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung werden 12 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionspolypeptid in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der

- 25 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- |            |                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------|
| Tag 0:     | 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)         |
| Tag 28:    | 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA) |
| Tag 56:    | 3. Immunisierung (icFA)                                 |
| 30 Tag 84: | 4. Immunisierung (PBS)                                  |
| Tag 87:    | Fusion                                                  |

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

#### **Beispiel 4: Nachweis der DHBV-ZPP vermittelten Zellpermeabilität**

5

Nachweis der durch das DHBV(Duck Hepatitis B-Virus)-ZPP vermittelten Zellpermeabilität wurde folgendermaßen geführt. Es wurde gemäß Standardmethoden ein Fusionsprotein bestehend aus einem hexa-His-Tag (6H), dem DHBV-ZPP und eGFP (enhanced green fluorescent protein) analog Beispiel 1 in einem E. coli Expressionssystem hergestellt. Es wurde das pQE-Vektorsystem der Fa. Qiagen angewendet. Dieses Protein (DHBV42-53eGFP) wurde isoliert. Für Kontrollexperimente wurde wt6HeGFP (Fusionsprotein aus 6 His und eGFP) verwendet. Es wurden nun 293-Zellen für 10 und 20 Min. in Gegenwart dieser Proteine inkubiert. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1  $\mu$ M dem Medium zugesetzt. Nach 10 bzw. 20 Min. wurden die Zellen lysiert und die cytosolische Fraktion der Zellen durch Ultrazentrifugation isoliert.

20

Der Nachweis des Vorhandenseins von DHBV42-53-eGFP in der Cytosolfraction erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines hexa-His-tag spezifischen Antikörpers (Fig. 6, Spuren 1-4) (anti-Hexa-His6 der Fa. Qiagen) bzw. eines eGFP-spezifischen Antikörpers (anti-eGFP der Fa. Clontech) (Fig. 6, Spuren 5-8). Zur Detektion wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (anti-Maus HRP, anti-Rabbit-HRP der Fa. Amersham) verwendet.

25

Der Western Blot zeigt, daß im Falle der Zugabe von DHBV42-53-eGFP eine Internalisation des Proteins in die Zelle (Cytosol) nach 10 Min. (Spuren 2, 6) bzw. 20 Min. (Spuren 4, 8) zu beobachten ist, während im Falle des Kontrollproteins wt6HeGFP, dem die Zellpermeabilität vermittelnde Sequenz fehlt, dies weder nach 10 Min. (Spuren 1, 5) noch nach 20 Minuten (Spuren 3, 7) zu beobachten ist.

30

Diese Ergebnisse zeigen, daß DHBV-ZPP in der Lage ist als Carrier für andere Proteine zu wirken.

**Patentanspruch**

- 5 1. Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP), wobei ZPP die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

X o i i o X X i o X i X

mit

- 10 X = Variable Aminosäure (hydrophil, hydrophob oder mit geladenen Seitengruppen)  
o = hydrophobe Aminosäure  
i = hydrophile Aminosäure

15 wobei ZPP kein natives HBV-Oberflächenprotein ist.

2. Zellpermeabilität-vermittelndes Polypeptid (ZPP) nach Anspruch 1, wobei ZPP die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt und kein natives HBV-Oberflächenprotein ist und wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert.
- 20

3. Nukleinsäure, kodierend für ZPP nach Anspruch 1 oder 2.

- 25 4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, wobei die Nukleinsäure eine DNA ist.

5. DNA nach Anspruch 4, umfassend:

- (a) Die DNA von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 hybridisiert und nicht für ein natives HBV-Oberflächenprotein kodiert, oder
- 30 (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code

verwandte DNA.

- 5
6. Expressionsplasmid, umfassend die Nukleinsäure nach Anspruch 3, 4 oder 5.
7. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung von ZPP, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen.
- 10
9. Antikörper, gerichtet gegen ZPP nach Anspruch 1 oder 2.
10. Verwendung von ZPP nach Anspruch 1 oder 2 zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.
- 15
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Substanzen Polypeptide, Nukleinsäuren und chemische Verbindungen umfassen.



P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Fig. 1

2/6

Fig. 2

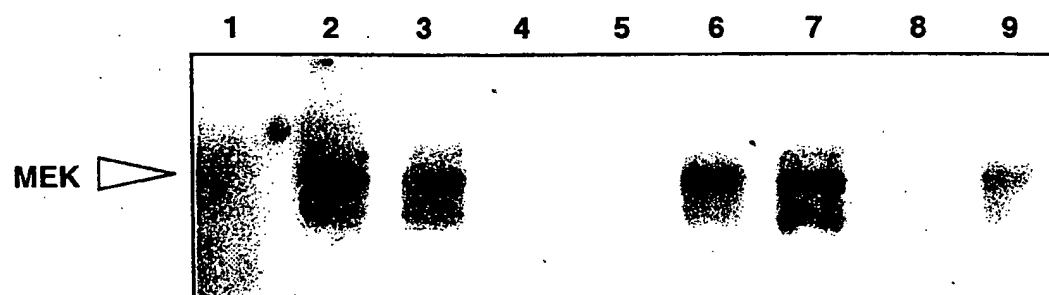


Fig. 3

3/6

**Tabelle 1: Konservierung des PreS2-TLM zwischen verschiedenen HBV-Subtypen**

Nukleotidsequenzen, Aminosäuresequenzen und Hydropathie-Werte der Aminosäureseitenketten (nach Kyte & Doolittle, 1982) des PreS2-TLM aus Subtyp ayw (1) im Vergleich zu sechs anderen HBV Subtypen ayw (2), adr (1), adr (2), ayr, adw und adw2. Die mit der Sequenz des PreS2-TLM aus Subtyp ayw (1) identischen Aminosäuren und die dazugehörigen Hydropathie-Werte sind fett dargestellt.

**Subtyp ayw (1)**

CCC	TTA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
<b>Pro</b>	<b>Leu</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Ser</b>	<b>Arg</b>	<b>Ile</b>	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>
-1.6	3.8	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

**Subtyp ayw (2)**

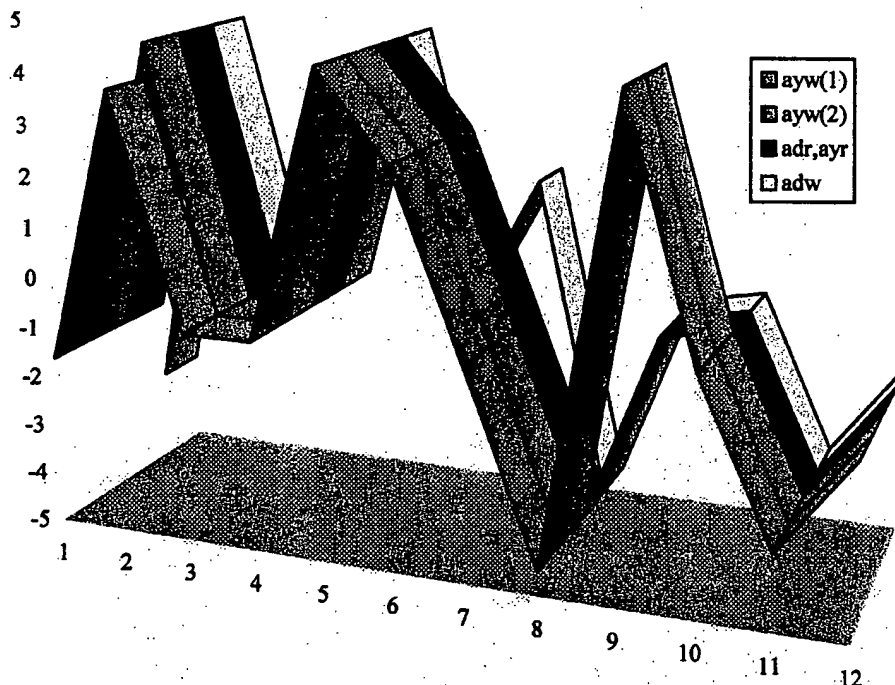
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
<b>Pro</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Ser</b>	<b>Arg</b>	<b>Ile</b>	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

**Subtypen adr (1), adr (2), ayr**

CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
<b>Pro</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Ser</b>	<b>Arg</b>	<b>Thr</b>	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

**Subtypen adw, adw2**

CAC	ATC	TCG	TCA	ATC	TCC	GCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
<b>His</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Thr</b>	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	<b>Pro</b>
-3.2	4.5	-0.8	-0.8	4.5	-0.8	1.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

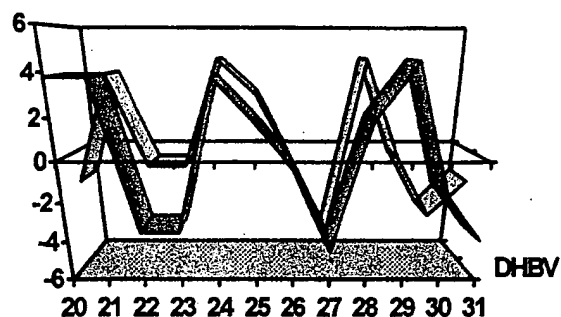
**Amphiphilie v n PreS2-TLM in verschiedenen HBV-Subtypen**

Darstellung der Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren im PreS2-TLM in Subtyp ayw (1) (blau) und den anderen HBV Subtypen ayw (2) (grün), adr (1), adr (2) ayr (rot) sowie adw und adw2 (grau). Auf der y-Achse sind die Hydropathie-Werte der Aminosäureseitenketten (nach Kyte & Doolittle, 1982) aufgetragen, positive Werte entsprechen hydrophoben, negative Werte hydrophilen Aminosäureseitenketten. Auf der x-Achse sind die 12 Aminosäuren des PreS2-TLM und der entsprechenden Sequenzen sechs anderer Subtypen aufgetragen mit dem N-terminalen Prolin an Position 1.

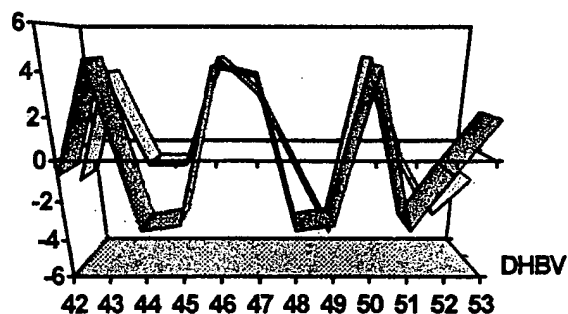
Fig. 4

4/6

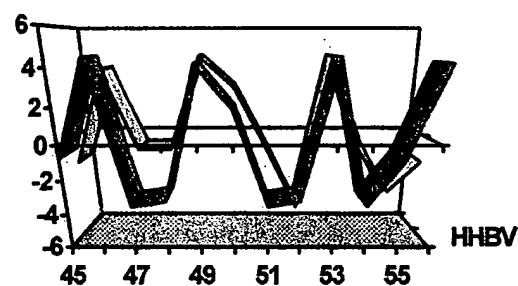
n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
20	L (Leu)	P (Pro)	3,8	-1,6
21	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
22	N (Asn)	S (Ser)	-3,5	-0,8
23	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
24	L (Leu)	I (Ile)	3,8	4,5
25	A (Ala)	F (Phe)	1,8	2,8
26	G (Gly)	S (Ser)	-0,4	-0,8
27	R (Arg)	R (Arg)	-4,5	-4,5
28	M (Met)	I (Ile)	1,9	4,5
29	I (Ile)	G (Gly)	4,5	-0,4
30	P (Pro)	D (Asp)	-1,6	-3,5
31	K (Lys)	P (Pro)	-3,9	-1,6



n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
42	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
43	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
44	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
45	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
46	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
47	L (Leu)	F (Phe)	3,8	2,8
48	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
49	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
50	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
51	Q (Gln)	G (Gly)	-3,5	-0,4
52	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
53	M (Met)	P (Pro)	1,9	-1,6



n	HHBV	PreS2-TLM	HHBV	PreS2-TLM
45	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
46	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
47	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
48	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
49	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
50	M (Met)	F (Phe)	1,9	2,8
51	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
52	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
53	I (Ile)	I (Ile)	4,5	4,5
54	D (Asp)	G (Gly)	-3,5	-0,4
55	S (Ser)	D (Asp)	-0,8	-3,5
56	V (Val)	P (Pro)	4,2	-1,6

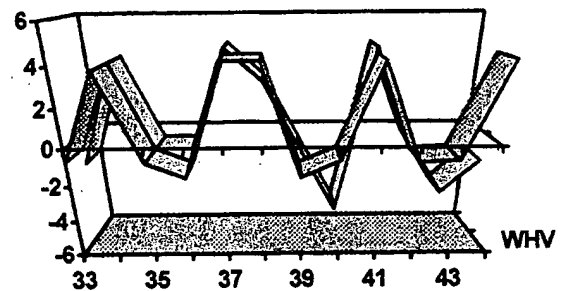


#### Amphiphile Motive in der PreS-Region verschiedener avianer Hepadnaviren

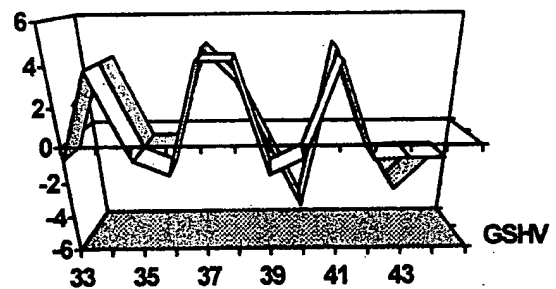
Vergleich der Hydropathie-Profile des PreS2-TLM (grün) mit Ausschnitten der PreS-Region von DHBV3 (rot) und HHBV (blau). In den Tabellen sind die Positionen der Aminosäuren in DHBV3 bzw. HHBV angegeben (n), zusammen mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Abschnittes und des PreS2-TLM. Zusätzlich sind die Hydropathie-Werte angegeben (nach Kyte & Doolittle, 1982). Zwischen den Aminosäuren 20 bis 31 und 42 bis 53 von DHBV3 bzw. 45 bis 56 von HHBV befinden sich Motive ähnlicher Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren wie im PreS2-TLM.

Fig. 5

n	WHV	PreS2-TLM	WHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	I (Ile)	P (Pro)	4,2	-1,6



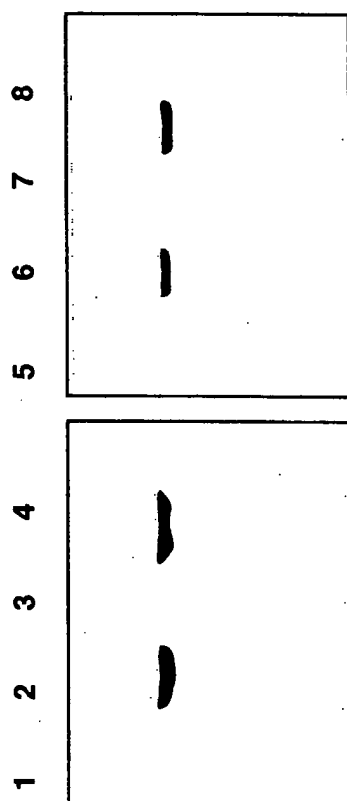
n	GSHV	PreS2-TLM	GSHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6



#### Amphiphile Motive in der PreS2-Region verschiedener Hepadnaviren der Nagetiere

Vergleich der Hydrophathie-Profile des PreS2-TLM (grün) mit Ausschnitten der PreS-Region von WHV (türkis) und GSHV (gelb). In den Tabellen sind die Positionen der Aminosäuren in WHV bzw. GSHV angegeben (n), zusammen mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Abschnittes und des PreS2-TLM. Zusätzlich sind die Hydrophathie-Werte angegeben (nach Kyte & Doolittle, 1982). Zwischen den Aminosäuren 33 bis 44 von PreS2 aus WHV und GSHV befinden sich Motive ähnlicher Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren wie im PreS2-TLM. Das Motiv ist zwischen den beiden Hepadnaviren konserviert.

Fig. 6

**DHBV42-53-EGFP ist ein zellpermeables Protein**

Immunoblot zytosolischer Lysate von 293-Zellen nach 10-minütiger (1, 2, 5, 6) bzw. 20-minütiger Inkubation (3, 4, 7, 8) mit 1 mM EGFP (1, 3, 5, 7) oder 1 mM DHBV42-53-EGFP (2, 4, 6, 8). Zur Ausführung des Immunoblottes wurden ein gegen den N-terminalen Hexa-His-Tag der rekombinanten Proteine (1-4) bzw. ein gegen EGFP gerichteter Antikörper verwendet (5-8).



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62,</b> <b>C07K 19/00, 16/08, C12N 15/87</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26379</b>  <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03506</b>  <b>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1999 (03.11.99)</b>  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 50 718.6      3. November 1998 (03.11.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE];</b> Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Stephanie [DE/DE];</b> Institut für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, Ismaninger Strasse 22, D-81675 München (DE).  <b>(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber &amp; Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</b>		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 5. Oktober 2000 (05.10.00)
<b>(54) Title: POLYPEPTIDE MEDIATING CELL PERMEABILITY</b>  <b>(54) Bezeichnung: ZELLPERMEABILITÄT-VERMITTELNDES POLYPEPTID</b>  <b>(57) Abstract</b>  The present invention relates to a cell-permeable polypeptide that can mediate cell permeability to substances, DNA coding for said polypeptide and a method for the production of said polypeptide. The invention also relates to antibodies directed against said polypeptide and the use of said polypeptide in the mediation of cell permeability to substances.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Polypeptid, das zellpermeabel ist und Zellpermeabilität an Substanzen vermitteln kann, eine für ein solches Polypeptid kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Polypeptids. Ferner betrifft die Erfindung gegen das Polypeptid gerichtete Antikörper sowie die Verwendung des Polypeptids zur Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen.		

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03506

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C07K16/08  
C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HILDT E. ET AL.: "Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator"</p> <p>ONCOGENE, vol. 11, no. 10, 16 November 1995 (1995-11-16), pages 2055-2066, XP000922823 page 2059, left-hand column; figure 4 page 2061, right-hand column; figure 7 page 2063, right-hand column, paragraph 2 -page 2065, left-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	2-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2000

Date of mailing of the international search report

20/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03506

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN) 3 August 1995 (1995-08-03) abstract page 57 page 62 -page 66 figure 8</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-9
X	<p>EP 0 456 215 A (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.) 13 November 1991 (1991-11-13) abstract page 22; claim 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,9
X	<p>WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides" BIOCHEMISTRY, vol. 36, 1997, pages 12869-12880, XP002141072 abstract page 12873, right-hand column, paragraph 2 -page 12874, left-hand column, paragraph 3; table 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,10,11
T	<p>OESS S. UND HILDT E. : "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, vol. 7, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 750-758, XP000922825</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520657 A	03-08-1995	AU 1532795 A	15-08-1995
		CA 2180726 A	03-08-1995
		EP 0738325 A	23-10-1996
EP 0456215 A	13-11-1991	AU 646039 B	03-02-1994
		AU 7648191 A	14-11-1991
		CA 2041772 A	12-11-1991
		JP 4228087 A	18-08-1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. . .ationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPK 7	C12N15/36	C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C07K16/08 C12N15/87
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  STRAND		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HILDT E. ET AL.: "Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcripational activator and identification of a minimal MHBst activator" ONCOGENE, Bd. 11, Nr. 10, 16. November 1995 (1995-11-16), Seiten 2055-2066, XP000922823 Seite 2059, linke Spalte; Abbildung 4 Seite 2061, rechte Spalte; Abbildung 7 Seite 2063, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 2065, linke Spalte, Absatz 1 --- -/--	2-9
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie         </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. Juli 2000		20/07/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Macchia, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 95 20657 A (GX BIOSYSTEMS A/S (DK); SOKURENKO; HASTY; KLEMM; PALLESEN; MOLIN) 3. August 1995 (1995-08-03) Zusammenfassung Seite 57 Seite 62 -Seite 66 Abbildung 8</p> <p>----</p>	1-9
X	<p>EP 0 456 215 A (ABBOTT LABORATORIES (US); MIMMS L.T.; FLOREANI M.F.) 13. November 1991 (1991-11-13) Zusammenfassung Seite 22; Anspruch 1</p> <p>----</p>	1,2,9
X	<p>WIEPRECHT T. ET AL.: "Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides" BIOCHEMISTRY, Bd. 36, 1997, Seiten 12869-12880, XP002141072 Zusammenfassung Seite 12873, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 12874, linke Spalte, Absatz 3; Tabelle 1</p> <p>----</p>	1,10,11
T	<p>OESS S. UND HILDT E. : "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 9, Mai 2000 (2000-05), Seiten 750-758, XP000922825</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03506

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9520657 A	03-08-1995	AU 1532795 A	15-08-1995
		CA 2180726 A	03-08-1995
		EP 0738325 A	23-10-1996
EP 0456215 A	13-11-1991	AU 646039 B	03-02-1994
		AU 7648191 A	14-11-1991
		CA 2041772 A	12-11-1991
		JP 4228087 A	18-08-1992

## **Polypeptide Mediating Cell Permeability**

The present invention relates to a polypeptide which is cell-permeable and can mediate cell permeability to substances, to a DNA coding for such a polypeptide and a method of producing such a polypeptide. The invention also concerns antibodies directed against the polypeptide and the use of the polypeptide in the mediation of cell permeability to substances.

The property of substances penetrating cells is called cell permeability. This property is, however, only found in few substances. Most substances require auxiliary means and/or methods to penetrate cells. Examples thereof are microinjection, eletroporation, association with cationic lipids, liposome formation, receptor-mediated endocytosis and viral infection. However, these auxiliary means or methods involve great drawbacks. In particular, they are expensive, require complex experimental set-ups and can be used only to a limited extent. Their efficiency degree is also low and they are often toxic.

Therefore, it is the object of the present invention to provide a product by means of which substances can be inserted in cells, the above drawbacks being avoided.

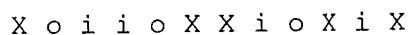
According to the invention this is achieved by the subject matters defined in the claims.

The present invention is based on applicant's insights that a polypeptide comprising preferably the amino acid sequence

of figure 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids may penetrate cells, i.e. has cell permeability. Applicant found such a polypeptide in the PreS2 region of a hepatitis B virus (HBV) surface protein. The polypeptide is referred to below as CPP "cell permeability-mediating polypeptide. CPP has the structure of an amphiphilic  $\alpha$ -helix. Applicant also detected that one of CPP's properties is to mediate cell permeability to substances. The latter may then penetrate cells, the cell permeability of the substances not being limited to certain cells. The substances also retain their activities (cf. figure 2). Figure 3 shows variants of the CPP according to the invention from various HBV subtypes which differ from the sequence of figure 1 by one or more amino acids. The amino acid sequence of figure 1 (= PreS2-TLM) fully corresponds e.g. to subtype ayw (1) on an amino acid level, whereas the other subtypes have one or more replacements as compared thereto. However, it can be seen that conservation of certain amino acids exists between various HBV subtypes. It can be confirmed in particular by a graphic representation of hydrophobicity values. From this it is possible to draw the conclusion that even if one or more amino acids are replaced, the hydropathy distribution in the whole molecule should be retained. Due to this finding it is easily possible for a person skilled in the art to determine variants of the sequence of figure 1, since it is not the sequence as such that is decisive but the hydropathy profile in the whole molecule. The same applies correspondingly to various avian hepadnaviruses (cf. figure 4) or hepadnaviruses of rodents (cf. figure 5). Each of them is compared with a CPP according to figure 1 of the invention (= PreS2-TLM) and hydropathy profiles are prepared. They show that even with an almost complete replacement of the amino acids (e.g. HHBV <--> PreS2-TLM) the hydropathy



profile is substantially retained. This means that it is not the sequence as such that is decisive but the order of hydrophilic and hydrophobic amino acids in an  $\alpha$ -helical motive. In a peptide comprising 12 amino acids, preferably positions 2, 5 and 9 are occupied by hydrophobic amino acids and positions 3, 4, 8, 11 are occupied by hydrophilic amino acids. The hydrophobic amino acids comprise valine, leucine, isoleucine, tryptophan, phenylalanine and methionine. The hydrophilic amino acids include glycine, serine, tyrosine, threonine, cysteine, asparagine and glutamine. A CPP according to the invention thus observes the following general formula:



wherein X = variable amino acid (hydrophilic, hydrophobic or with charged side groups)

o = hydrophobic amino acid

i = hydrophilic amino acid

Amino acids having charged side groups are aspartate, glutamate (both have negatively charged side groups), lysine, asparagine, glutamine, arginine and histidine (all have positively charged side groups).

According to the invention applicant's insights are utilized to provide a polypeptide (CPP) which can mediate cell permeability to substances, CPP comprising the above indicated sequence or preferably the sequence of figure 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids and being no native HBV surface protein and hybridizing the DNA of the latter amino acid sequence with the DNA of figure 1.

The term "mediating cell permeability to substances" refers to the fact that CPP can mediate cell permeability to substances of any kind and origin. The substances may be e.g. polypeptides (proteins), nucleic acids or chemical compounds. Examples of polypeptides are structural polypeptides, tumor necrosis factor, interferons, interleukins, lymphokines, growth factors, plasma proteins, e.g. blood clotting factors and metabolic enzymes, and receptors. In particular, the polypeptides may be those which may increase the immunogenicity of cells. These may be polypeptides not occurring in tumor cells, e.g. cytokines, such as IL-2, and GM-CSF, and co-stimulatory molecules, such as B7-1, tumor-associated antigens, e.g. MAGE1, tyrosinases and viral polypeptides, e.g. E7 of human papilloma virus and EBNA-3 polypeptide of Epstein-Barr virus. The polypeptides may also be adapter polypeptides, oligomerization motives of a polypeptide, polypeptide fragments of viral coat polypeptides, hormones and ribozymes. Examples of nucleic acids are those which may code for the above polypeptides. They may also be antisense oligonucleotides, peptide-nucleic acids and consensus sequences for transcription factors. Examples of chemical compounds are medicaments which have no polypeptide structure. These may be cytostatic agents, anesthetics, antihistaminics, antibiotics and antimycotics. For mediating cell permeability it may suffice to incubate CPP together with a substance so as to form chemical bonds, e.g. covalent or non-covalents bonds. It is favorable for CPP to be linked with the substance via a linker, which may be done e.g. via biotin/streptavidine. The linker may be available at the N-terminus or C-terminus of CPP. It is particularly advantageous for the substance to be present as polypeptide together with CPP in a fusion polypeptide. CPP may in this case be available at the N-terminus or C-terminus or within the polypeptide structure of the

substance. Therefore, the term "CPP" also comprises a fusion polypeptide in which CPP is present together with a substance. Mediation of cell permeability to substances may be detected by common methods. It is favorable to incubate cells with CPP-linked substances and detect the penetration or presence of CPP and/or the substances in the cells. This may be done e.g. by specific antibodies or reagents which react directly or indirectly with CPP and/or the substances.

The term "an amino acid sequence differing by one or more amino acids" comprises any CPP-preparing amino acid sequence which is not a native HBV surface protein. A sequence which codes for "an amino acid sequence differing by one or more amino acids" hybridizes preferably with the DNA sequence of figure 1. The DNA sequence may differ from the DNA of figure 1 by additions, deletions, substitutions and/or inversions of one or more base pairs. The term "hybridization" refers to a hybridization under common conditions, in particular at 20°C below the melting point of the sequence.

Another subject matter of the present invention is a nucleic acid which codes for CPP. The nucleic acid may be an RNA or a DNA. Preferred is a DNA which comprises the following:

- (a) the DNA of figure 1 or a DNA differing therefrom by one or more base pairs, wherein the latter DNA hybridizes with the DNA of figure 1 and does not code for a native HBV surface protein, or
- (b) a DNA related to the DNA of (a) via the degenerated genetic code.

The expression "a DNA differing by one or more base pairs" comprises any DNA sequence coding for a CPP, which

hybridizes with the DNA of figure 1 and does not code for a native HBV surface protein. The DNA sequence may differ from the DNA of figure 1 by additions, deletions, substitutions and/or inversions of one or more base pairs. As to the expression "hybridization" reference is made accordingly to the above explanations.

A DNA according to the invention may be present as such or in a vector. In particular, a DNA according to the invention may be present in an expression vector. Examples thereof are known to the person skilled in the art. In the case of an expression vector for *E. coli* these are e.g. pGEMEX, pUC derivatives, pGEX-2T, pET3b and pQE-8. For the expression in yeast e.g. pY100 and Ycpad1 have to be mentioned while e.g. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV and pRK5 have to be indicated for the expression in animal cells. The baculovirus expression vector pAcSGHisNT-A is particularly suitable for the expression in insect cells.

The person skilled in the art knows suitable cells to express the DNA according to the invention, present in an expression vector. Examples of such cells comprise the *E. coli* strains HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 and M15pRep4, the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*, the animal cells L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 and 293, the insect cells Sf9 and Sf21 and the plant cells *Lupinus albus*.

The person skilled in the art is familiar with methods and conditions of transforming or transfecting cells with an expression vector containing the DNA according to the invention and culturing the cells. He also knows methods of isolating and purifying the CPP expressed by the DNA according to the invention.

Another subject matter of the present invention is an antibody directed against CPP. Such an antibody may be prepared by common methods. It may be polyclonal or monoclonal. For its preparation it is favorable to immunize with CPP animals - in particular rabbits or chickens for a polyclonal antibody and mice for a monoclonal antibody. Further boosters of the animals may also be made with CPP. The polyclonal antibody may then be obtained from the animal serum or egg yolk. For preparing the monoclonal antibody, animal spleen cells are fused with myeloma cells.

Another subject matter of the present invention is a kit. Such a kit comprises one or more of the following components:

- (a) a cell permeability-mediating polypeptide according to the invention (CPP),
- (b) a DNA according to the invention,
- (c) an antibody according to the invention, and
- (d) common auxiliary agents, such as carriers, buffers, solvents, controls, etc.

One or more representatives of the individual components may be present each. As to the individual terms reference is made to the above explanations.

The present invention enables cell permeability to be mediated. Cell permeability can be mediated to substances of any kind and origin by a CPP according to the invention. The cell permeability is universal, i.e. it is not limited to certain cells. The cells may also be present *ex vivo* or *in vivo*. In addition, the cell permeability does not trigger any toxic effects.

The present invention is thus perfectly suited for diagnosis and therapy. The latter comprises influencing the expression of genes and metabolic processes. In particular, the present invention is suited for the diagnosis and therapy of the severest diseases, e.g. of tumors. The present invention distinguishes itself in particular in that it can be used for both conservative and gene-therapeutic measures.

**Brief description of the drawings.**

**Figure 1** shows the amino acid and DNA sequences of a cell permeability-mediating polypeptide according to the invention (CPP).

**Figure 2** shows the detection of CPP-mediated cell permeability. Lanes 2 and 3 show the activation of c-Raf1 kinase. Lanes 4 and 5 show the inhibition thereof. Lanes 6 and 7 show that mutated CPP-PLAP (CPP-KLAP) has no inhibitory effect.

**Figure 3** shows the conservation of the amino acid sequence between various HBV subtypes as well as the hydropathy profile.

**Figure 4** shows amphiphilic motives in the PreS region of various avian hepadnaviruses.

**Figure 5** shows amphiphilic motives in the PreS2 region of various hepadnaviruses of rodents.

**Figure 6** shows that DHBV42-53-EGFP is a cell-permeable protein.

The present invention is explained by the below examples.

**Example 1: Detection of cell permeability mediated by a polypeptide (CPP) according to the invention.**

The detection of cell permeability mediated by CPP is shown by inhibition of the TNF $\alpha$ -dependent activation of c-Raf1 kinase. The activation of the c-Raf1 kinase is based on the interaction between the TNF receptor I (TNF-R1) and the adapter molecule Grb2. For this purpose, the SH3 domain of Grb2 interacts with a PLAP motive from the cytoplasmic domain of TNF-R1.

CPP is provided in the form of a fusion polypeptide. In this fusion polypeptide referred to as CPP-PLAP CPP, the amino acid sequence of figure 1 is present as N-terminus partner and a PLAP motive from the cytoplasmic domain of TNF-R1 is present as C-terminus partner. A fusion polypeptide referred to as CPP-KLAP is also provided, which has a mutated PLAP motive.

HeLa cells are incubated for 2 h with 2  $\mu$ M CPP-PLAP or CPP-KLAP (control) and stimulated for 15 min with 100  $\mu$ /ml TNF $\alpha$ . The activation of c-Raf1 kinase is determined by an immunocomplex test using MEK (Santa Cruz, Biotech) and  $\gamma^{32}$ P-ATP as substrate (cf. figure 2).

It shows that CPP-PLAP reaches the cells and fully inhibits the activation of C-Raf1 kinase (cf. figure 2, lanes 4 and 5). It also turns out that CPP-KLAP does not achieve inhibition (cf. figure 2, lanes 6 and 7).

**Example 2: Preparation and purification of a cell permeability-mediating polypeptide (CPP) according to the invention.**

The DNA of figure 1 is provided at the 5' end with a BgIII linker and at the 3' end with a BamHI linker and is subsequently cleaved with the corresponding restriction enzymes. The resulting BgIII/BamHI fragment is inserted in the BamHI-cleaved expression vector pQe8 so as to obtain the expression plasmid pQe8/CPP.

One sequence coding for GST (glutathione S transferase) is also isolated from the expression plasmid pGex-1. At its 5' end it has a BamHI restriction site followed by a sequence coding for a thrombin restriction site. At its 3' end the sequence has a BamHI restriction site. The sequence is inserted in the BamHI-cleaved expression plasmid pQe8/CPP so as to obtain the expression plasmid pQe8/CPP-GST. It codes for the fusion polypeptide CPP-GST, pQe8/CPP-GST is used for the transformation of *E. coli* SG 13009 (cf. Gottesmann, S. et al., J. Bacteriol. 148 (1981), 265-273). The bacteria are cultured in an LB broth with 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin and induced for 4 h with 60 µM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Following induction, lysis of the sedimented and washed bacteria is carried out by means of ultrasound. The CPP-GST fusion polypeptide is isolated by means of affinity chromatography on a glutathione column. The bound CPP-GST fusion polypeptide is eluted from 0 to 10 mM by means of a linear increase in the glutathione concentration. The eluted CPP-GST fusion protein is subjected to thrombin cleavage. The hexa-His-CPP (fusion polypeptide) released in this way is subsequently isolated by affinity chromatography using denaturing conditions by means of an Ni-NTA agarose. This is done in the presence of



6 M urea in accordance with the instructions from the manufacturer (Quiagen company). The bound hexa-His-CPP is eluted in a buffer having pH 6.3, containing 250 mM imidazole. The hexa-His-CPP is subjected to 18 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis and stained using coomassie blue (cf. Thomas, J.O. and Kornberg, R.D., J. Mol. Biol. 149 (1975), 709-733).

It shows that a (fusion) polypeptide according to the invention can be prepared in highly pure form.

**Example 3: Preparation and detection of an antibody according to the invention**

A fusion polypeptide of Example 2 according to the invention is subjected to 18 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis. After staining the gel with 4 M sodium acetate, an about 3 kD band is excised out of the gel and incubated in phosphate-buffered common salt solution. Gel pieces are sedimented before the protein concentration of the supernatant is determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis followed by coomassie blue staining. Animals are immunized as follows with the gel-purified fusion polypeptide.

**Immunization protocol for polyclonal antibodies in rabbits**

35 µg of gel-purified fusion polypeptide in 0.7 ml PBS and 0.7 ml of complete or incomplete Freund's adjuvant are used per immunization:

Day 0: 1<sup>st</sup> immunization (complete Freund's adjuvant)  
Day 14: 2<sup>nd</sup> immunization (incomplete Freund's adjuvant;  
icFA)  
Day 28: 3<sup>rd</sup> immunization (icFA)

Day 56: 4<sup>th</sup> immunization (icFA)

Day 80: bleeding to death.

The rabbit serum is tested in an immunoblot. For this purpose, a fusion polypeptide of Example 2 according to the invention is subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose filter (cf. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10 (1984), 203-209). The Western blot analysis was carried out as described in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229. For this purpose, the nitrocellulose filter is incubated with a first antibody at 37°C for one hour. This antibody is the rabbit serum (1:10000 in PBS). After several wash steps using PBS, the nitrocellulose filter is incubated with a second antibody. This antibody is an alkaline phosphatase-coupled monoclonal goat anti-rabbit IgG antibody (Dianova company) (1:5000) in PBS. 30 minutes of incubation at 37°C are followed by several wash steps using PBS and subsequently by the alkaline phosphatase detection reaction with developer solution (36 µM 5'-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 400 µM nitro blue tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) at room temperature until bands are visible.

It shows that polyclonal antibodies according to the invention can be prepared.

#### **Immunization protocol for polyclonal antibodies in chickens**

40 µg of gel-purified fusion polypeptide in 0.8 ml PBS and 0.8 ml of complete or incomplete Freund's adjuvant are used per immunization.

Day 0: 1<sup>st</sup> immunization (complete Freund's adjuvant)

Day 28: 2<sup>nd</sup> immunization (incomplete Freund's adjuvant;  
icFA)  
Day 50: 3<sup>rd</sup> immunization (icFA)

Antibodies are extracted from egg yolk and tested in a Western blot. Polyclonal antibodies according to the invention are detected.

#### **Immunization protocol for monoclonal antibodies in mice**

12 µg of gel-purified fusion polypeptide in 0.25 ml PBS and 0.25 ml of complete or incomplete Freund's adjuvant are used per immunization. In the fourth immunization, the fusion protein is dissolved in 0.5 ml (without adjuvant).

Day 0: 1<sup>st</sup> immunization (complete Freund's adjuvant)  
Day 28: 2<sup>nd</sup> immunization (incomplete Freund's adjuvant;  
icFA)  
Day 56: 3<sup>rd</sup> immunization (icFA)  
Day 84: 4<sup>th</sup> immunization (PBS)  
Day 87: fusion

Supernatants of hybridomas are tested in a Western blot. Monoclonal antibodies according to the invention are detected.

#### **Example 4: Detection of the cell permeability mediated by DHBV-CPP**

Detection of the cell permeability mediated by DHBV (duck hepatitis B virus)-CPP was made as follows: According to standard methods a fusion protein consisting of a hexa-His-Tag (6H), DHBV-CPP and eGFP (enhanced green fluorescent protein) was prepared in analogy to Example 1 in an *E. coli*

expression system. The pQE vector system of the Quiagen company was used. This protein (DHBV42-53eGFP) was isolated. wt6HeGFP (fusion protein of 6 His and eGFP) was used for control experiments. Then, 293 cells were incubated in the presence of these proteins for 10 and 20 minutes. The proteins were added to the medium at a concentration of 1  $\mu$ M. After 10 or 20 minutes, the cells were lyzed and the cytosolic fraction of the cells was isolated by ultracentrifugation.

The presence of DHBV42-53-eGFP in the cytosol fraction was detected by means of Western blot analysis using a hexa-His-tag-specific antibody (figure 6, lanes 1-4) (anti-hexa-His6 of Qiagen company) or an eGFP-specific antibody (anti-eGFP of Clontech company) (figure 6, lanes 5-8). A peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse HRP, anti-rabbit-HRP of Amersham company) was used for the detection.

The Western blot shows that when DHBV42-53-eGFP is added an internalization of the protein into the cell (cytosol) can be observed after 10 min. (lanes 2, 6) or 20 minutes (4, 8) whereas in the case of the control protein wt6HeGFP which lacks the sequence mediating cell permeability this cannot be observed after either 10 minutes (lanes 1, 5) or 20 minutes (lanes 3, 7).

These results show that DHBV-CPP is capable of acting as a carrier for other proteins.

### Claims

1. Polypeptide mediating cell permeability (CPP), wherein CPP comprises the following amino acid sequence:

X o i i o X X i o X i X

in which

X = variable amino acid (hydrophilic, hydrophobic  
or with charged side groups)

o = hydrophobic amino acid

i = hydrophilic amino acid

wherein CPP is no native HBV surface protein.

2. The polypeptide mediating cell permeability (CPP) according to claim 1, wherein CPP comprises the amino acid sequence of figure 1 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids and is no native HBV surface protein and wherein the DNA sequence of the latter amino acid sequence hybridizes with the DNA of figure 1.
3. A nucleic acid, coding for CPP according to claim 1 or 2.
4. The nucleic acid according to claim 3, wherein the nucleic acid is a DNA.
5. A DNA according to claim 4, comprising:
  - (a) the DNA of figure 1 or a DNA differing therefrom by one or more base pairs, wherein the latter DNA

hybridizes with the DNA of figure 1 and does not code for a native HBV surface protein, or

(b) a DNA related to the DNA of (a) via the degenerated genetic code.

6. An expression plasmid, comprising the nucleic acid according to claim 3, 4 or 5.
7. A transformant, containing the expression plasmid according to claim 6.
8. A method of preparing CPP, comprising culturing the transformant according to claim 7 under suitable conditions.
9. An antibody directed against CPP according to claim 1 or 2.
10. Use of CPP according to claim 1 or 2 for mediating cell permeability to substances.
11. Use according to claim 10, wherein the substances comprise polypeptides, nucleic acids and chemical compounds.

**Abstract of the Disclosure**

The present invention relates to a cell-permeable polypeptide that can mediate cell permeability to substances, DNA coding for said polypeptide and a method for the production of said polypeptide. The invention also relates to antibodies directed against the polypeptide and the use of said polypeptide in the mediation of cell permeability to substances.

P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
	T										

Fig. 1



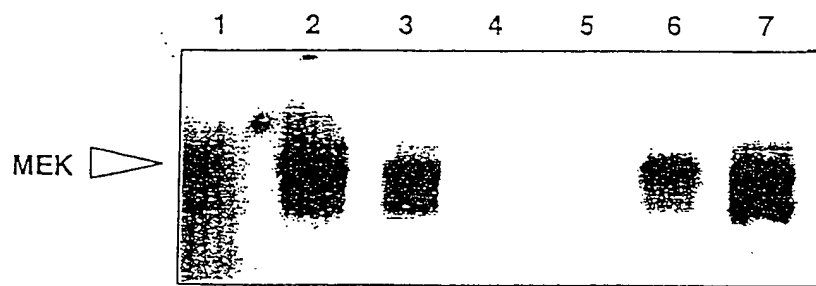


Fig. 2

### Conservation of PreS2-TLM between various HBV subtypes

Nucleotide sequences, amino acid sequences and hydropathy values of the amino acid side chains (according to Kyte & Doolittle, 1982) of PreS2-TLM from subtype ayw (1) as compared to six other HBV subtypes ayw (2), adr (1), adr (2), ayr, adw and adw2. The amino acids identical with the sequence of PreS2-TLM of subtype ayw (1) and the associated hydropathy values are shown in boldface.

#### Subtype ayw (1)

CCC	TTA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
Pro	Leu	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro
-1.6	3.8	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

#### Subtype ayw (2)

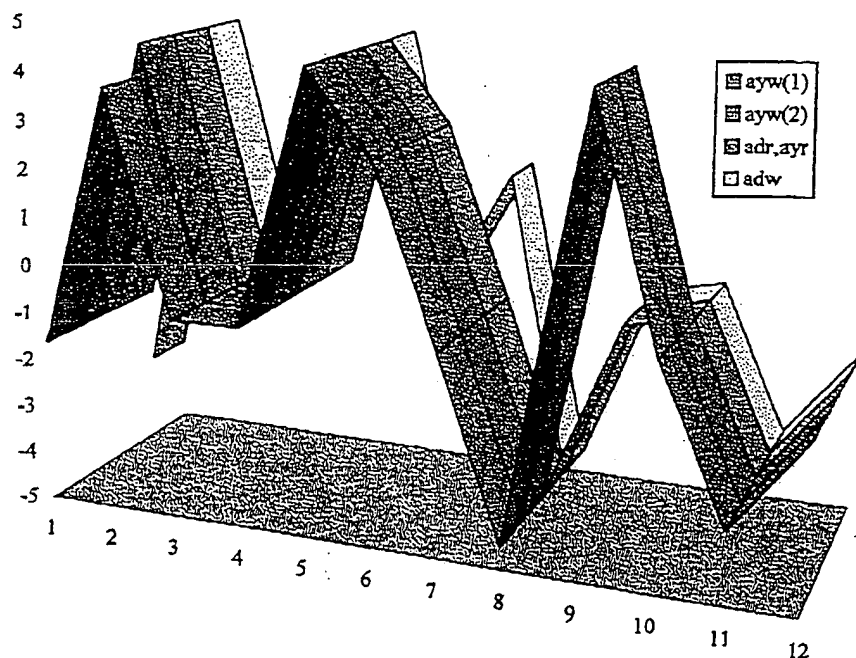
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT
Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	4.5	-0.4	-3.5	-1.6

#### Subtypes adr (1), adr (2), ayr

CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
-1.6	4.5	-0.8	-0.8	4.5	2.8	-0.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

#### Subtypes adw, adw2

CAC	ATC	TCG	TCA	ATC	TCC	GCG	AGG	ACT	GGG	GAC	CCT
His	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro
-3.2	4.5	-0.8	-0.8	4.5	-0.8	1.8	-4.5	-0.7	-0.4	-3.5	-1.6

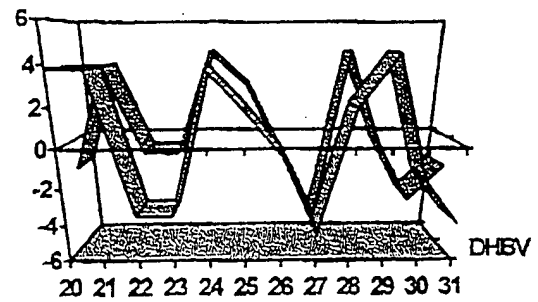


### Amphiphilia of PreS2-TLM in various HBV subtypes

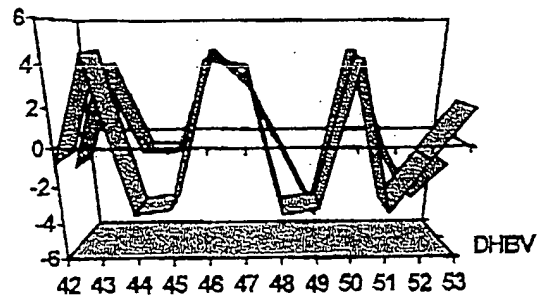
Representation of the distribution of the hydrophilic and hydrophobic amino acids in PreS2-TLM in subtype ayw (1) (blue) and the other HBV subtypes ayw (2) (green), adr (1), adr (2), ayr (red) as well as adw and adw2 (gray). The hydropathy values of the amino acid side chains (according to Kyte & Doolittle, 1982) are plotted on the y-axis, positive values correspond to hydrophobic amino acid side chains and negative values correspond to hydrophilic ones. The 12 amino acids of PreS2-TLM and the corresponding sequences of six other subtypes are plotted on the x-axis, the N-terminal proline being located at position 1.

Fig. 3

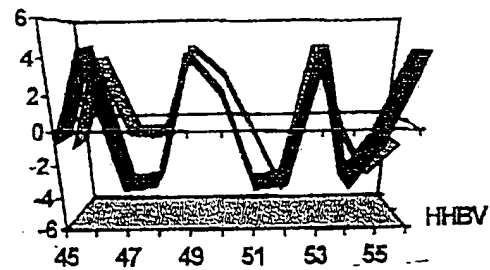
n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
20	L (Leu)	P (Pro)	3,8	-1,6
21	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
22	N (Asn)	S (Ser)	-3,5	-0,8
23	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
24	L (Leu)	I (Ile)	3,8	4,5
25	A (Ala)	F (Phe)	1,8	2,8
26	G (Gly)	S (Ser)	-0,4	-0,8
27	R (Arg)	R (Arg)	-4,5	-4,5
28	M (Met)	I (Ile)	1,9	4,5
29	I (Ile)	G (Gly)	4,5	-0,4
30	P (Pro)	D (Asp)	-1,6	-3,5
31	K (Lys)	P (Pro)	-3,9	-1,6



n	DHBV	PreS2-TLM	DHBV	PreS2-TLM
42	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
43	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
44	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
45	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
46	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
47	L (Leu)	F (Phe)	3,8	2,8
48	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
49	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
50	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
51	Q (Gln)	G (Gly)	-3,5	-0,4
52	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
53	M (Met)	P (Pro)	1,9	-1,6



n	HHBV	PreS2-TLM	HHBV	PreS2-TLM
45	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
46	I (Ile)	L (Leu)	4,5	3,8
47	Q (Gln)	S (Ser)	-3,5	-0,8
48	H (His)	S (Ser)	-3,2	-0,8
49	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
50	M (Met)	F (Phe)	1,9	2,8
51	D (Asp)	S (Ser)	-3,5	-0,8
52	H (His)	R (Arg)	-3,2	-4,5
53	I (Ile)	I (Ile)	4,5	4,5
54	D (Asp)	G (Gly)	-3,5	-0,4
55	S (Ser)	D (Asp)	-0,8	-3,5
56	V (Val)	P (Pro)	4,2	-1,6

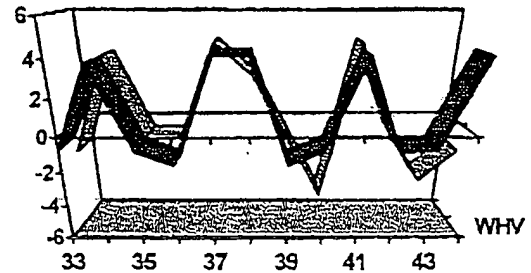


#### Amphiphilic motives in the PreS region of various avian hepadnaviruses

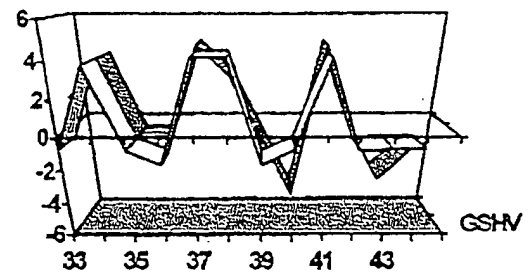
Comparison of the hydropathy profiles of PreS2-TLM (green) with segments of the PreS region of DHBV3 (red) and HHBV (blue). The positions of the amino acids in DHBV3 and HHBV are indicated in the tables (n) together with the amino acid sequence of the corresponding segment and the PreS2-TLM. The hydropathy values are also indicated (according to Kyte & Doolittle, 1982). Motives having a distribution of hydrophobic and hydrophilic amino acids similar to that in PreS2-TLM are found between amino acids 20 to 31 and 42 to 53 of DHBV3 or 45 to 56 of HHBV.

Fig. 4

n	WHV	PreS2-TLM	WHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	I (Ile)	P (Pro)	4,2	-1,6



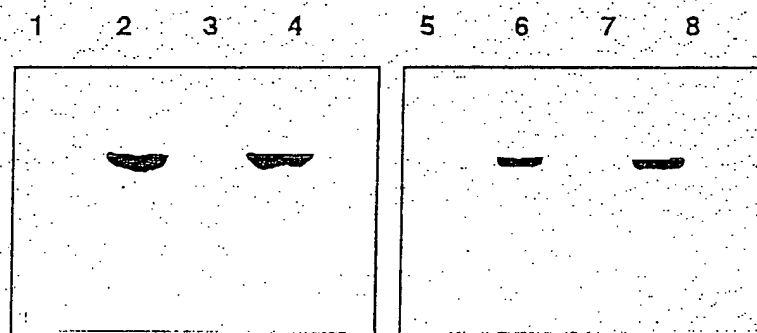
n	GSHV	PreS2-TLM	GSHV	PreS2-TLM
33	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6
34	L (Leu)	L (Leu)	3,8	3,8
35	S (Ser)	S (Ser)	-0,8	-0,8
36	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
37	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
38	V (Val)	F (Phe)	4,2	2,8
39	P (Pro)	S (Ser)	-1,6	-0,8
40	T (Thr)	R (Arg)	-0,7	-4,5
41	V (Val)	I (Ile)	4,2	4,5
42	S (Ser)	G (Gly)	-0,8	-0,4
43	T (Thr)	D (Asp)	-0,7	-3,5
44	T (Thr)	P (Pro)	-0,7	-1,6



#### Amphiphilic motives in the PreS2 region of various hepadnaviruses of rodents

A comparison of the hydropathy profiles of PreS2-TLM (green) with segments of the PreS region of WHV (turquoise) and GSHV (yellow). The positions of the amino acids in WHV and GSHV are indicated in the tables (n) together with the amino acid sequence of the corresponding segment and the PreS2-TLM. The hydropathy values are also indicated (according to Kyte & Doolittle, 1982). Motives having a distribution of hydrophobic and hydrophilic amino acids similar to that in PreS2-TLM are found between amino acids 33 to 44 of PreS2 from WHV and GSHV. The motive is conserved between both hepadnaviruses.

Fig. 5



**DHBV42-53-EGFP is a cell-permeable protein**

Immunoblot of cytosolic lysates of 293 cells after 10 minutes (1, 2, 5, 6) or 20 minutes of incubation (3, 4, 7, 8) with 1 mM EGFP (1, 3, 5, 7) or 1 mM DHBV 42-53-EGFP (2, 4, 6, 8). For carrying out the immunoblot, an antibody directed against the N-terminal hexa-His-Tag of the recombinant proteins (1-4) or directed against EGFP was used (5-8).

Fig. 6